

10/506328

PCT/JP 03/02132

日本国特許庁 PTO 02 SEP 2004 #2

JAPAN PATENT OFFICE

20.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月 4日

出願番号

Application Number:

特願2002-104506

[ST.10/C]:

[JP2002-104506]

出願人

Applicant(s):

学校法人東京農業大学

REC'D 16 MAY 2003

WIPO

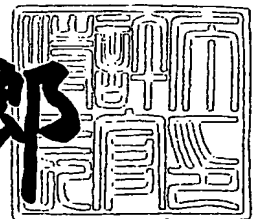
PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3031605

【書類名】 特許願

【整理番号】 TUA-P002

【提出日】 平成14年 3月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01H 4/00
A01H 5/56

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京農業大学内

 【氏名】 藤垣 順三

【特許出願人】

 【識別番号】 598096991

 【住所又は居所】 東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号

 【氏名又は名称】 学校法人東京農業大学

 【代表者】 松田 藤四郎

 【電話番号】 (03)5477-2532

 【連絡先】 東京農業大学 総合研究所 高橋 英樹

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【特許出願人】

【ファクシミリ番号】 (03) 5477-2634

【書類名】 明細書

【発明の名称】 シクラメン塊根の生産法、それを用いるシクラメンのクローン植物の増殖法並びにこれらの方法で得られる塊根及びクローン植物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シクラメンの根の一部又は全部を切除し、該切除部に塊根（球根）を形成させることを特徴とするシクラメン塊根の生産法。

【請求項2】 シクラメンの根の一部又は全部を切除し、その状態で塊根形成用培地の中で生育させることにより、該切除部に塊根（球根）を形成させることを特徴とするシクラメン塊根の生産法。

【請求項3】 シクラメンとして、シクラメンの種子を無菌的に播種し、発芽・発根した植物を使用する請求項1又は請求項2記載のシクラメン塊根の生産法。

【請求項4】 塊根形成用培地として、Murashige & Skoog培地（MS培地）又はこれを基とする培地に植物ホルモンを添加したものを使用する請求項2又は請求項3記載のシクラメン塊根の生産法。

【請求項5】 塊根形成用培地として、多量要素を1/3～1/2としたMS培地（修正MS培地）に、0.01～0.05mg/l濃度の α -ナフタレン酢酸（NAA）及び0.01～10.0mg/l濃度のベンジルアミノプリン（BA）を添加し、シヨ糖濃度を30～90g/lとなるよう調整し、寒天6～8g/l添加して固形化した培地を使用する請求項4記載のシクラメン塊根の生産法。

【請求項6】 請求項1～請求項5のいずれかに記載の方法で形成されたシクラメン塊根を発芽・発根させることにより、クローン植物を得ることを特徴とするシクラメンの増殖法。

【請求項7】 シクラメン塊根を発芽・発根用培地又は土壌中で発芽・発根させる請求項6記載のシクラメンの増殖法。

【請求項8】 発芽・発根用培地として、無機塩成分を1/3としたMS培地に、0.01～0.05mg/l濃度のNAA及び0.01～10.0mg/l濃度のBAを添加し、シヨ糖濃度を30～90g/lとなるよう調整し、6～

8 g / l となるよう寒天を加えた固形培地を使用する請求項 7 記載のシクラメンの増殖法。

【請求項 9】 請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の方法で生産したことを特徴とするシクラメン塊根。

【請求項 10】 請求項 6 ～請求項 8 のいずれかに記載の方法で増殖・生育したことを特徴とするシクラメンのクローン植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、シクラメンの根に特殊な方法で塊根（球根）を形成させることによりシクラメン塊根を生産する方法、その方法で得られた塊根、さらには、それを用いて遺伝的に安定なシクラメンのクローン個体を増殖する方法、及びその方法で増殖したシクラメンのクローン植物に関する。

【0002】

【従来の技術】

シクラメンは虫媒による他家受精植物であるが、人為的に自殖も可能である。しかし、自殖を繰り返すことにより自殖弱勢が現れるため、通常は個体間の交配により種子を生産されている。そのため、遺伝的に固定した、いわゆる純系個体を得ることができない。特にシクラメンの四倍体品種では、遺伝的に固定することは極めて困難である。

このような問題を解決するために、シクラメンの植物体組織片を培養して遺伝的に同じ形質を表す個体を得るための栄養繁殖方法が開発されてきた。それらの多くは、組織片を培養してカルスを誘導し、それから不定芽・不定根を分化させた後に幼苗を形成させる増殖法である。

【0003】

このような増殖法として、安藤らは、暗黒条件下で葉柄部分を徒長させることにより得られる黄化葉柄を用いたシクラメンの増殖法を提案している（千葉大学園芸学部報告，vol. 32，pp. 1-5，1983）。また、大橋らは、種子を殺菌した無菌幼植物からシクラメンを増殖させる方法を検討している（栃木

県農業試験所研究報告, No. 36, pp. 93-108, 1989)。しかし、これらのカルスから不定芽や不定根を確実に再分化させることは難しく、これによりシクラメンを増殖させる方法はいずれも効率が悪い。また、これらの方法では遺伝的変異の生じることが報告されている。

【0004】

一方、市橋らは、固形培地上で誘導した不定芽を外植片とし、これを液体培養することにより塊茎様体を誘導する方法を検討し、固形培地のみを使用する方法よりも効率良くシクラメンを増殖させる方法を提案している（岐阜県農業総合研究センター研究報告, no. 5, pp. 1-23, 1992）。しかし、この液体培養による方法でも塊茎様体の発芽率は低い。

【0005】

さらに、特願平8-134499号では、シクラメンの葉柄を液体培養して塊茎様体を生産する際に、液体培地中の糖質濃度をいったん高めることにより発芽率の高いシクラメン塊茎様体を得ることが提案されている。しかし、葉柄を培養する方法を実際に試してみると、品種によっては塊茎様体を得られない場合があり、再現性・安定性に問題があること、かつ、増殖して株を得られた場合でも、株を得るまでに6ヶ月程度の日数を要するため、効率が悪いことがわかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上述のような従来法に比べて、格段に再現性よく安定的かつ効率的にシクラメンの塊根（球根）を生産し得る方法、その塊根を用いてシクラメンのクローン植物を増殖・生育する方法、並びに上記の方法で得られる塊根、遺伝的に安定なクローン植物を提供しようとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本来、シクラメンは、胚軸が肥大して塊茎を形成し、そこから発芽・発根する植物であり、これまでシクラメンの塊根（球根）を形成させ、この塊根を用いてシクラメンのクローン植物を増殖するという方法は知られていない。本発明者は、シクラメンのクローン植物を効率的に増殖させる方法について研究を進め、特

殊な方法でシクラメンの根に塊根を形成させることに成功した。本発明は、このような新知見に基づき、上記の塊根を生産する方法及びこの塊根から発芽・発根させ、安定的かつ効率的にシクラメンのクローン植物を増殖・生育させる方法等を提供するものである。

【0008】

本発明によれば、上記の各課題は、下記的手段によって達成される。

(1) シクラメンの根の一部又は全部を切除し、該切除部に塊根（球根）を形成させることを特徴とするシクラメン塊根の生産法。

(2) シクラメンの根の一部又は全部を切除し、その状態で塊根形成用培地の中で生育させることにより、該切除部に塊根（球根）を形成させることを特徴とするシクラメン塊根の生産法。

(3) シクラメンとして、シクラメンの種子を無菌的に播種し、発芽・発根した植物を使用する上記(1)～(2)のシクラメン塊根の生産法。

(4) 塊根形成用培地として、植物ホルモンを添加したMurashige & Skoog培地（MS培地）又はこれを基とする培地を使用する上記(2)～(3)のシクラメン塊根の生産法。

(5) 塊根形成用培地として、多量要素を1/3～1/2としたMS培地（修正MS培地）に、0.01～0.05mg/l濃度の α -ナフタレン酢酸（NAA）及び0.01～10.0mg/l濃度のベンジルアミノプリン（BA）を添加し、ショ糖濃度を30～90g/lとなるよう調整し、寒天6～8g/l添加して固形化した培地を使用する上記(4)のシクラメン塊根の生産法。

(6) 上記(1)～(5)の方法で形成されたシクラメン塊根を発芽・発根させることにより、クローン植物を得ることを特徴とするシクラメンの増殖法。

(7) シクラメン塊根を発芽・発根用培地又は土壤中で発芽・発根させる上記(6)のシクラメンの増殖法。

(8) 発芽・発根用培地として、無機塩成分を1/3としたMS培地に、0.01～0.05mg/l濃度のNAA及び0.01～10.0mg/l濃度のBAを添加し、ショ糖濃度を30～90g/lとなるよう調整し、6～8g/lとなるよう寒天を加えた固形培地を使用する上記(7)のシクラメンの増殖法。

(9) 上記(1)～(5)の方法で生産したシクラメン塊根。

(10) 上記(6)～(8)の方法で増殖・生育したシクラメンのクローン植物

【0009】

すなわち、本発明によれば、好ましくは、試験管内などで無菌的に発芽・発根させたシクラメンの根の全部又は一部を切除し、これを植物ホルモンを含む固形培地又は液体培地で培養することによって、その根の切除部に塊根を形成させ、目的とするシクラメンのクローン植物の塊根を安定的に生産することができる。そして、この塊根を母体から切り離し、新たな培地中又は土壌中で培養することにより、発芽・発根させて遺伝的にも安定なクローン植物を得ることができる。

【0010】

本発明で 사용할 ことができるシクラメンは、栽培品種に限らず、野生種も使用できる。これらの種子を表面殺菌した後、例えばMurashige & Skoog培地(MS培地)などに無菌播種し、そこで発芽・発根した幼植物だけでなく、同様な培地に何代も継代した植物なども用いることができる。また、形成された塊根を発芽・発根させ、それらを次の材料として用いることもできる。これらは発芽・発根した幼植物に限らず、葉や茎も有する生長した植物でもよい。

【0011】

本発明では、発根したシクラメンの根の一部又は全部を切除し、その状態で、適当な固形もしくは液状の培地中または土壌中にて培養することにより、根の切除部に塊根を発生させる。この際、適当な培地で培養するのがよく、このような根塊形成用培地として、Murashige & Skoog培地(MS培地)又はこれを基とする修正MS培地培地などに少なくとも1種の植物ホルモンを添加した固形又は液状培地が好適に使用され、この培地に、無菌植物の根の全部又は一部を切除して置床する。通常、ほぼ30日間培養すれば目で見えるほどの小さな塊根類が、部分的又は全体的に切除した根の先端部に生成してくる。培養は、暗黒下で静置培養するのが好ましいが、弱光下で行ってもよく、また培養液を流通させた状態で行ってもよい。

【0012】

好ましい塊根形成用培地としては、Murashige & Skoog培地 (MS培地)、White培地、Lismaier & Skoog培地、GamborgのB5培地等の組織培養用培地に、1種又は2種以上の植物ホルモンを添加したものが挙げられる。なかでも、MS培地、多量要素（窒素、リン酸、カリウム）を $1/3 \sim 1/2$ としたMS培地（修正MS培地）などに植物ホルモンを添加して使用することが好ましい。

特に好ましい塊根形成用培地としては、多量要素を $1/3 \sim 1/2$ としたMS培地（修正MS培地）に植物ホルモンとし $0.01 \sim 0.05 \text{ mg/l}$ 濃度のNAA及び $0.05 \sim 10.0 \text{ mg/l}$ （特に好ましくは $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/l}$ ）濃度のBAを添加し、シヨ糖濃度を $30 \sim 90 \text{ g/l}$ となるよう調整し、寒天 $6 \sim 8 \text{ g/l}$ 添加して固形化した培地を挙げることができる。

【0013】

このように培養して生成した塊根は、これを母体より切り離して、直ちに発芽・発根させることもできるが、安定的に増殖・生育させるには、切り離さずに更に同じ組成の新しい培地に移して継代培養し、塊根をより肥大させた後で切り離すのが好ましい。

【0014】

上述のような本発明の方法により得られた塊根は、適正な培地中で30日間程度培養して発芽・発根させるとシクラメンのクローン植物を得ることが出来、元のシクラメンと同一の形状・色調を有する花卉を再現させることができる。この段階の培養に使用する発芽・発根用培地としては、例えば、無機塩成分を $1/3$ としたMS培地に植物ホルモンとして $0.01 \sim 0.05 \text{ mg/l}$ 濃度のNAA及び $0.05 \sim 10.0 \text{ mg/l}$ （好ましくは $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/l}$ ）濃度のBAを添加し、シヨ糖濃度を $30 \sim 90 \text{ g/l}$ となるよう調整し、 $6 \sim 8 \text{ g/l}$ となるよう寒天を加えた固形培地を使用すればよい。この段階の培養は $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 下で、弱光又は暗黒下（好ましくは暗黒条件下）で行う。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施態様について説明する。

本発明では、まず、シクラメンの種子を例えば1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液等で表面を滅菌後、培養試験管などに無菌的に播種し、発芽・発根させる。植物に内生菌が存在すると本発明の再現性が低下するので、無菌的に培養するのが適当である。

次いで、発芽・発根した植物の根の全部又は一部を切除し、その状態で適当な培地中で培養し、切除した根の先に小さな塊根を生成させる。切除する根の本数や切除部位には特に制限はないが、生産性・作業性などの観点から複数の根の先端部を切除するのが好ましい。このように根の一部又は全部を切除した状態で適当な培地中で培養すると、その根の先に塊根類が形成されるということは従来全く知られておらず、本発明者によって初めて見出された新事実である。

【0016】

根の全部又は一部を切除したシクラメンの培養に使用するのに適した塊根形成用培地としては、既に述べたように、MS培地あるいは多量要素を1/3～1/2としたMS培地（修正MS培地）などに1種又は2種以上の植物ホルモンを添加したものが好適である。

【0017】

培地に添加する植物ホルモンとしては、NAA（ α -ナフタレン酢酸）、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、インドール酢酸等のオーキシニン類やBA（ベンジルアミノプリン）、カイネチン、ゼアチン等のサイトカイニン類を例示することができる。特に好ましくは、植物ホルモンとして、NAAを0.01～0.05 mg/l濃度そしてBAを0.05～10 mg/l濃度（特に0.1～1.0 mg/l濃度）で培地に添加する。また、この培養に使用する培地の炭素源としては、ショ糖やブドウ糖等の糖質を例示することができるが、好ましくはショ糖を使用する。なお、糖質濃度は、30～90 g/lを例示することができるが、好ましくは50～70 g/lで培養する。この培地は寒天6～8 g/l添加して固形化したものが特に好適に使用される。

【0018】

上記培地のpHは5.0～8.0、好ましくは7.0に調整する。そして、培

養は15～25℃、好ましくは15～20℃に設定して行う。なお、培養は光照射条件下（500～5,000ルクス、好ましくは1,000～2,000ルクス）で行ってもよいし、暗黒条件下で行ってもよいが、暗黒条件下の方がより好ましい。

このような条件で、ほぼ30日間培養すれば、目で見えるほどの小さな塊根類が切除した根の先端部に生成してくる。

【0019】

このようにして得られたシクラメンの塊根類を母体から切り離し、新たな培地（発芽・発根用培地）に置床し、30日間程度培養して発芽・発根させるとクローン植物となる。したがって、本発明によれば、当初のシクラメン種子から約3ヶ月程度で効率的にクローン植物を得ることが可能となる。

なお、この段階の培養に使用する発芽・発根用培地としては、例えば、前述したように無機塩成分を1/3としたMS培地に0.01～0.05mg/l濃度のNAA及び0.05～10.0mg/l濃度のBA（好ましくは0.1～1.0mg/l）を添加し、シヨ糖濃度を30～90g/lとなるよう調整し、6～8g/lとなるよう寒天を加えた固形培地を使用すればよい。培養は室温下で、弱光又は暗黒下（好ましくは暗黒条件下）で行う。

【0020】

また、このようにして得られた塊根類を水道水で洗浄し、その後次第に自然状態に馴化し、塊根として乾燥に耐える状態にし、それをシクラメンクローン植物の塊根として栽培者などに供給することもできる。この塊根類を他の植物の塊根のように鉢植えし、灌水してやることにより植物体を得ることも可能である。

【0021】

【実施例】

以下に実施例に示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれによって限定されるものではない。

【0022】

【実施例1】

<無菌幼植物の育成>

シクラメン（品種；ドレッシースカレット）の種子を、70%エチルアルコールに10秒、次に有効塩素濃度1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬し、表面殺菌を行った。次いで、この種子を滅菌水で3回洗浄した後表面の次亜塩素酸ナトリウムを取り除いた。これをシヨ糖を30g/l、寒天を6g/l含むMS培地に無菌播種し、20℃、弱光の条件で30日間培養し発芽・発根させた。

【0023】

＜塊根の生産＞

上述の発芽・発根したシクラメン幼植物の根の先端部をメスで切除し培地に置床した。培地としては、多量要素を1/3にした修正MS培地に、植物ホルモンとして表1～表3に示す濃度でNAA及びBAを添加し、これにシヨ糖を30～90g/l添加した多数の試験区を準備した。いずれの培地にも寒天6g/l加え、pH=7.0として、オートクレーブで滅菌処理した固形培地10mlを50ml容の培養試験管に入れた。これらの培地に置床した幼植物を、20℃、弱光下で一定日数静置培養し、根の先端部に塊根類を得た。その結果を後掲の表1、表2及び表3に示す。

【0024】

＜塊根類の発芽＝クローン植物の増殖＞；

このようにして得られたシクラメンの塊根を母体から切り離し、後掲の表4に示すように、修正MS培地にNAA、BAを添加し、これにシヨ糖を30～90g/l添加した試験区に置床した。培地には寒天6g/l加え、pH=7.0としてオートクレーブで滅菌処理した固形培地とした。培養試験管は毎日照明下12時間と暗黒条件下12時間静置した。その結果、塊根類が肥大しながら発芽・発根した。これらの実験結果を表4に示す。

【0025】

さらに、発芽・発根のための培養時の光の照射の影響について調べた。すなわち、後掲の表5の下欄外に示すA、B、C、Dの4種の培地を使用し、それぞれの直上から1500ルクスの照明を毎日一定時間ずつ照射して発芽・発根の様子を観察した。なお、表5中の照射時間0は暗黒下での培養を意味する。その結

果、表5に示すとおり、暗黒下での培養が最も効果的であることがわかった。

【0026】

【表1】

異なる培地における塊根形成数（培養開始30日目）

| シニ糖 g/l | BA (mg/l) | NAA 6g/D | | | | | |
|------------|--------------|----------|------|------|------|------|------|
| | | 0.00 | | 0.01 | | 0.05 | |
| | | 塊根総数 | 大塊根数 | 塊根総数 | 大塊根数 | 塊根総数 | 大塊根数 |
| 30 | 0.1 | 18 | 4 | 15 | 5 | 15 | 5 |
| " | 1.0 | 6 | 2 | 5 | 3 | 7 | 6 |
| " | 10.0 | 11 | 6 | 5 | 5 | 8 | 4 |
| 50 | 0.1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 14 | 7 |
| " | 1.0 | 16 | 11 | 16 | 11 | 9 | 4 |
| " | 10.0 | 7 | 6 | 10 | 3 | 8 | 4 |
| 70 | 0.1 | - | - | 8 | 4 | 14 | 12 |
| " | 1.0 | 16 | 11 | 19 | 11 | 11 | 9 |
| " | 10.0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 14 | 8 |

基本培地：1/3MS培地+寒天6g/l pH=7.0

塊根総数は培養により形成された塊根総数

大塊根数はそのうちの直径1mm以上の塊根数

【0027】

【表2】

異なる培地における塊根形成数

| シニ糖 g/D | BA (mg/l) | NAA (mg/l) | 置床 球茎数 | 平均塊根数 | |
|------------|--------------|---------------|-----------|-------|------|
| | | | | 30日目 | 50日目 |
| 50 | 0.1 | 0.05 | 5 | 2.8 | 2.8 |
| " | 1.0 | " | " | 4.8 | 4.8 |
| " | 2.0 | " | " | 0.6 | 0.6 |
| " | 5.0 | " | " | 1.8 | 1.8 |
| 70 | 0.1 | " | " | 4.4 | 4.4 |
| " | 1.0 | " | " | 0.8 | 0.8 |
| " | 2.0 | " | " | 3.2 | 3.2 |
| " | 5.0 | " | " | 1.0 | 1.0 |
| 90 | 0.1 | " | " | 2.4 | 2.4 |
| " | 1.0 | " | " | 1.6 | 1.6 |
| " | 2.0 | " | " | 1.0 | 1.0 |
| " | 5.0 | " | " | 0.8 | 0.8 |

基本培地：1/3MS培地+寒天6g/l pH=7.0

平均塊根数は球茎1個当たりの塊根数

【0028】

【表3】

塊根形成に及ぼす培地の影響 (30日目)

| BA mg/D | シニ糖 g/D | 置床 球茎数 | 切除した 根の総数 | 生成塊根数 | 肥大率 |
|------------|------------|-----------|--------------|-------|-----|
| 0.1 | 30 | 5 | 17 | 17 | 2.3 |
| 0.1 | 50 | 5 | 17 | 16 | 3.2 |
| 0.1 | 70 | 5 | 21 | 21 | 3.8 |
| 0.1 | 90 | 5 | 18 | 18 | 5.0 |
| 0.5 | 30 | 5 | 20 | 20 | 6.6 |
| 0.5 | 50 | 5 | 21 | 20 | 9.5 |
| 0.5 | 70 | 5 | 25 | 25 | 7.2 |
| 0.5 | 90 | 5 | 16 | 16 | 6.0 |
| 1.0 | 30 | 5 | 23 | 23 | 8.4 |
| 1.0 | 50 | 5 | 24 | 23 | 6.3 |
| 1.0 | 70 | 5 | 17 | 17 | 5.4 |
| 1.0 | 90 | 5 | 4 | 3 | 3.8 |

基本培地：1/3MS+NAA 0.05mg/l+寒天6g/l pH=7.0

切除した根の総数=先端部を切除した根の総本数

肥大率=培養開始時の根の直径を1として算出した塊根直径の割合 (平均値)

【0029】

【表4】

塊根からの形態形成に及ぼす培地の影響

| BA mg/D | シニ糖 g/D | 供試塊 根数 | 塊根の肥大率 | | | 発根率 (%) | | | 発芽率 | | |
|------------|------------|-----------|--------|------|-------|---------|------|-------|------|------|-------|
| | | | 60日目 | 97日目 | 127日目 | 60日目 | 97日目 | 127日目 | 60日目 | 97日目 | 127日目 |
| 0.05 | 30 | 5 | 2.17 | 2.41 | 2.47 | 40 | 40 | 40 | 20 | 80 | 80 |
| 0.05 | 50 | 5 | 2.83 | 3.43 | 4.23 | 20 | 80 | 80 | 20 | 60 | 60 |
| 0.05 | 70 | 5 | 3.32 | 3.95 | 3.95 | 0 | 60 | 60 | 40 | 40 | 40 |
| 0.05 | 90 | 5 | 1.93 | 2.11 | 2.11 | 20 | 60 | 60 | 40 | 40 | 40 |
| 0.1 | 30 | 5 | 2.05 | 2.35 | 2.35 | 40 | 80 | 80 | 40 | 60 | 60 |
| 0.1 | 50 | 5 | 2.40 | 2.90 | 3.10 | 40 | 40 | 60 | 20 | 40 | 60 |
| 0.1 | 70 | 5 | 1.40 | 2.47 | 2.73 | 0 | 0 | 20 | 20 | 40 | 40 |
| 0.1 | 90 | 5 | 2.68 | 3.28 | 3.28 | 40 | 40 | 40 | 0 | 0 | 20 |
| 0.5 | 30 | 5 | 3.23 | 3.97 | 4.23 | 20 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 0.5 | 50 | 5 | 2.52 | 2.85 | 3.25 | 0 | 0 | 20 | 40 | 60 | 60 |
| 0.5 | 70 | 5 | 2.16 | 2.67 | 2.67 | 20 | 20 | 20 | 20 | 40 | 40 |
| 0.5 | 90 | 5 | 2.67 | 4.98 | 5.78 | 20 | 20 | 20 | 0 | 60 | 60 |
| 1.0 | 30 | 5 | 2.25 | 3.50 | 3.95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 40 |
| 1.0 | 50 | 5 | 2.27 | 3.18 | 4.02 | 0 | 20 | 20 | 20 | 40 | 40 |
| 1.0 | 70 | 5 | 2.25 | 4.03 | 4.81 | 20 | 40 | 60 | 0 | 20 | 20 |
| 1.0 | 90 | 5 | 1.84 | 2.11 | 2.47 | 20 | 40 | 40 | 40 | 60 | 60 |
| 5.0 | 30 | 5 | 1.00 | 1.08 | 1.12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| 5.0 | 50 | 5 | 1.10 | 1.10 | 1.10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5.0 | 70 | 5 | 1.17 | 1.24 | 1.34 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 | 20 |
| 5.0 | 90 | 5 | 1.55 | 1.55 | 1.80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 |

塊根の肥大率=培養開始時の塊根直径を1として算出した培養後の塊根の直径の割合。

基本培地：1/3MS培地+NAA 0.05mg/l+寒天6g/l pH=7.0

【0030】

【表 5】

塊根からの形態形成に及ぼす照明時間の影響

| 照明時間 | 培地 A | | | 培地 B | | | 培地 C | | | 培地 D | | |
|----------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|
| | 発芽のみ | 発根のみ | 発芽・発根 | 発芽のみ | 発根のみ | 発芽・発根 | 発芽のみ | 発根のみ | 発芽・発根 | 発芽のみ | 発根のみ | 発芽・発根 |
| 24 h/day | 4 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | — | — | — |
| 16 h/day | 3 | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | — | — | — |
| 12 h/day | 0 | 6 | 0 | 6 | 0 | 0 | 4 | 0 | 2 | — | — | — |
| 8 h/day | 3 | 2 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | — | — | — |
| 0 | 2 | 6 | 1 | 7 | 0 | 1 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |

注：各培地に10個ずつ塊根を置床。基本培地は 1/3MS培地 + NAA 0.05mg/l + 寒天6g/l, pH=7.0

—：未実験区

培地 A: BA 0mg/l、ショ糖 90g/l

培地 B: BA 0.05mg/l、ショ糖 30g/l

培地 C: BA 0.5mg/l、ショ糖 90g/l

培地 D: BA 0.5mg/l、ショ糖 50g/l

【0031】

【比較例 1】

比較のため、シクラメン（品種；フラメンコ）の葉片及び葉柄片を、それぞれ、1/3MS培地+NAA 0.05mg/l + 寒天6g/l からなる pH=7.0 の基本培地において、添加する BA 及びショ糖の濃度を変えて30日間培養を行った。その結果を後掲の表 6 に示すが、いずれの場合も、培養で大きく肥大化したものは少なく、まして再分化まで至ったものは稀で、再現性よくクローン植物を得ることはできなかった。

【0032】

【表 6】

異なる培地に植え込んだ外植片の肥大及び再分化数

| BA(mg/l) | ショ糖(g/l) | 葉 片 | | | 葉 柄 片 | | |
|----------|----------|-----|----|-----|-------|----|-----|
| | | 置床数 | 肥大 | 再分化 | 置床数 | 肥大 | 再分化 |
| 0.05 | 30 | 20 | 1 | 0 | 20 | 2 | 0 |
| 0.05 | 50 | 20 | 0 | 0 | 20 | 1 | 0 |
| 0.05 | 70 | 20 | 0 | 0 | 20 | 1 | 0 |
| 0.05 | 90 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 0.1 | 30 | 20 | 2 | 1 | 20 | 4 | 4 |
| 0.1 | 50 | 20 | 1 | 0 | 20 | 5 | 1 |
| 0.1 | 70 | 20 | 0 | 0 | 20 | 2 | 0 |
| 0.1 | 90 | 20 | 0 | 0 | 20 | 1 | 0 |
| 0.5 | 30 | 20 | 2 | 2 | 20 | 3 | 1 |
| 0.5 | 50 | 20 | 4 | 1 | 20 | 4 | 1 |
| 0.5 | 70 | 20 | 1 | 0 | 20 | 1 | 0 |
| 0.5 | 90 | 20 | 2 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 1 | 30 | 20 | 6 | 3 | 20 | 1 | 0 |
| 1 | 50 | 20 | 4 | 2 | 20 | 1 | 10 |
| 1 | 70 | 20 | 3 | 1 | 20 | 0 | 0 |
| 1 | 90 | 20 | 5 | 1 | 20 | 0 | 0 |

基本培地: 1/3MS+NAA0.05mg/l+寒天6g/l

【0033】

【発明の効果】

本発明の方法により得られるシクラメンの塊根類（塊根様体）は、どのシクラメン品種（野生種も含む）でも安定的に形成され、最短では約3ヶ月でクローン株を得ることができる。しかも、遺伝的にも安定しており、従来法よりも極めて効率的にシクラメンのクローン苗を得ることができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 シクラメンの塊根（球根）を安定的かつ効率的に生産し、それによりクローン植物を提供する。

【解決手段】 シクラメンを無菌的に育て、その根の一部又は全部先端部を切除し適当な培地中などで培養することによって当該部分に塊根（球根）を形成させる。その塊根を切り離して培養し発芽・発根させて、遺伝的に同じ個体（クローン植物）を作る。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598096991]

| | |
|----------|------------------|
| 1. 変更年月日 | 1998年 7月21日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 |
| 氏 名 | 学校法人東京農業大学 |